

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-080295

(43)Date of publication of application : 31.03.1998

---

(51)Int.Cl. C12P 21/00  
// C07H 21/02  
C07H 21/04  
C12N 15/09

---

(21)Application number : 09-090685

(71)Applicant : NIPPON FLOUR MILLS CO LTD

(22)Date of filing : 09.04.1997

(72)Inventor : YAMANE TSUNEO

NAKANO HIDEO

TANAKA TADAAKI

SEKIGUCHI SATORU

---

(30)PriorityPriority number : 08184372 Priority date : 15.07.1996 Priority country : JP

---

(54) SYNTHESIS OF PROTEIN BY CELL-FREE PROTEIN SYNTHETIC SYSTEM AND APPARATUS THEREFOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for synthesizing a protein by using a cell-free protein synthetic system, capable of stably and simply synthesizing a sufficient amount of protein and a method for synthesizing the protein.

SOLUTION: In the synthesis of a protein using a cell-free protein synthetic system containing a cell-free extract, a synthetic reaction solution containing cell-free extracted solution and low molecule substrate is brought through a membrane into contact with a low molecular substrate solution and the low molecular substrate in the low molecular substrate solution is transferred to a synthetic reaction solution by molecular diffusion. Thereby, the concentration of low molecular substrate in the synthetic reaction solution is kept to nearly constant value and low molecular by-products in the synthetic reaction solution are discharged into the low molecular substrate solution.

---

LEGAL STATUS

---

[Date of request for examination] 06.10.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 10-80295

(43) 公開日 平成 10 年 (1998) 3 月 31 日

(51) Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12P 21/00			C12P 21/00	C
// C07H 21/02			C07H 21/02	
21/04			21/04	B
C12N 15/09		9282-4B	C12N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平 9-90685	(71) 出願人	000231637 日本製粉株式会社 東京都渋谷区千駄ヶ谷 5 丁目 27 番 5 号
(22) 出願日	平成 9 年 (1997) 4 月 9 日	(72) 発明者	山根 恒夫 愛知県名古屋市中千種区若水 3 丁目 22-1
(31) 優先権主張番号	特願平 8-184372	(72) 発明者	中野 秀雄 愛知県岩倉市東新町下境 52 岩倉団地 6 1-206 号
(32) 優先日	平 8 (1996) 7 月 15 日	(72) 発明者	田中 忠明 神奈川県横浜市旭区東希望が丘 169 ヘルメゾン東希望が丘 203 号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 中村 稔 (外 7 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無細胞タンパク合成系によるタンパクの合成方法及び装置

(57) 【要約】

【課題】 安定かつ簡便に十分な量のタンパクを合成させることのできる、無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成方法、及びタンパクの合成装置を提供すること。

【解決手段】 無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成方法において、無細胞抽出液及び低分子基質を含有する合成反応液と、低分子基質溶液とを膜を介して接触させ、分子拡散によって低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させることにより、合成反応液中の低分子基質濃度をほぼ一定に維持するとともに、合成反応液中の低分子副産物を低分子基質溶液中に排出させることを特徴とするタンパクの合成方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成方法において、無細胞抽出液及び低分子基質を含有する合成反応液と、低分子基質溶液とを膜を介して接触させ、分子拡散によって低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させることにより、合成反応液中の低分子基質濃度をほぼ一定に維持するとともに、合成反応液中の低分子副産物を低分子基質溶液中に排出させることを特徴とするタンパクの合成方法。

【請求項 2】 無細胞抽出液が小麦胚芽抽出液である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成装置において、無細胞抽出液及び低分子基質を含有する合成反応液の収容室と、低分子基質溶液の収容室を、膜を介して接触させ、分子拡散によって低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させ、且つ、合成反応液中の低分子副産物を低分子基質溶液中に排出させるようにしたことを特徴とするタンパクの合成装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成方法及びタンパクの合成装置に関する。ここで無細胞タンパク合成系とは、mRNA の情報を読み取ってタンパクやポリペプチドを合成する無細胞翻訳系、並びに DNA を鋳型として RNA を合成する無細胞転写系と無細胞翻訳系の両者を含む系の何れをも意味するものとする。

## 【0002】

【従来の技術】無細胞タンパク合成系を用いたタンパクやポリペプチドの製造方法として、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球、大腸菌等の抽出液を用いる方法が知られている。しかしながら、それらの抽出液を用いて量的に十分なタンパクを合成することは難しく、タンパクの合成量を増加させる為の種々の工夫がなされてきた。その一つとして、特開平 1-50311 号公報には、mRNA、ATP、GTP 及びアミノ酸を基質として含んでいるリボソームの無細胞タンパク合成系において、最終副産物である AMP、GDP、ピロリン酸塩、無機りん酸及び合成された主生産物のポリペプチドを含んでいる翻訳生成物を限外濾過膜を介して反応系から取り出し、それと同時にアミノ酸、ATP 及び GTP の形態の基質を、それらの初期濃度を維持するために反応系へ供給するポリペプチドの製造方法が記載されている。この方法によれば、従来の方法では 1 時間程度でポリペプチドの合成が停止してしまうものが、40 時間以上に渡って反応が継続し、合成されるポリペプチドの収量も大きく増加することが示されている。

【0003】また、この改良法として、特開平 4-20

0390 号公報には、基質の送液系や反応系中の気相の介在を最小限に制御することにより、反応槽内の圧力の変動を減らして基質の送液を安定化して、ポリペプチドを合成する方法が記載されている。更に、反応系より反応生成物を取り出す限外濾過膜を反応系の側面もしくは上面に置くことにより、下面に置くのに比べて膜の目詰りが軽減されることも合わせて記載されている。しかしながら、これらの方法は、高価な機器と厳密な送液条件を必要とし、また、限外濾過膜の目詰りが避けられない

10 といった問題点があった。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的は、上記の従来技術の問題点を解決し、安定かつ簡便に十分な量のタンパクを合成させることのできる、無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成方法、及びタンパクの合成装置を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】前記の目的を達成するために、本発明者らは鋭意研究を重ね、無細胞タンパク合成に必要な低分子基質、例えばタンパクの合成材料であるアミノ酸や合成反応に必要なエネルギー源である ATP、GTP 等の濃度を、膜を通した分子拡散によって初期濃度に維持することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。本発明は、無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの製造方法において、無細胞抽出液及び低分子基質を含有する合成反応液と、低分子基質溶液とを膜を介して接触させ、分子拡散によって低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させることにより、合成反応液中の低分子基質濃度をほぼ一定に維持するとともに、合成反応液中の低分子副産物を低分子基質溶液中に排出させることを特徴とするタンパクの合成方法を提供するものである。

【0006】本発明はさらに、無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成装置において、無細胞抽出液及び低分子基質を含有する合成反応液の収容室と、低分子基質溶液の収容室を、膜を介して接触させ、分子拡散によって低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させ、且つ、合成反応液中の低分子副産物を低分子基質溶液中に排出させるようにしたことを特徴とするタンパクの合成装置を提供するものである。

【0007】本発明はまた、基質溶液を収容する密閉基質容器と；キャピラリー膜を有し、入口部を上記密閉基質容器に連通したバイオリアクターと；吸入側を上記バイオリアクターの出口部に連通し、排出側を上記密閉基質容器に連通したベリスタルチックポンプとを有し；上記バイオリアクターにおいて、上記キャピラリー膜の一方の側に収容されたタンパク合成反応液と他方の側に収容された上記基質溶液とを上記キャピラリー膜を介して接触させることを特徴とするタンパク合成装置を提供す

るものである。本発明はさらに、バイオリアクターにキャピラリー膜を介して接する二つの画室を形成し、一方の画室にタンパク合成反応液を収容し、他方の画室に基質溶液を収容し、タンパク合成反応液と基質溶液とを上記キャピラリー膜を介して接触させることを特徴とするタンパク合成装置を提供するものである。

#### 【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明に使用する無細胞抽出液の調製から無細胞タンパク合成系におけるタンパク合成活性の測定までの各段階について詳細に説明する。本発明に使用する無細胞抽出液としては、例えば、小麦胚芽抽出液及び大腸菌細胞抽出液等があげられる。この明細において、タンパク合成活性は、合成された酵素タンパクの酵素量(1 unit: 1分間に1  $\mu$ molの基質を変化させる酵素量)で表す。

#### i 無細胞抽出液の調製と抽出液の濃縮

無細胞抽出液の調製は、用いる材料に応じて異なるが、通常のいかなる方法を用いても良い。また、抽出液の濃縮は、特開平6-225783号公報に記載された方法等、いかなる方法を用いても良い。

#### ii 無細胞タンパク合成反応

反応液には、無細胞抽出液の他、目的とするタンパクをコードするDNA、mRNA、RNAポリメラーゼ、タンパクの構成アミノ酸、緩衝剤、ATP、GTP等のエネルギー源、クレアチンホスフェート、クレアチンホスフォキナーゼ、ホスフォエノールビルビン酸、ビルビン酸キナーゼ等のATP再生系、ジチオスレイトール(DTT)、スベルミン、スベルミジン等の安定化剤、RNase阻害剤等を適量加える。反応は、用いる無細胞抽出液及び目的とするタンパクの種類等により最適の温度で行われ、一般に20~40℃が適当である。

【0009】合成反応液中の各成分の濃度は特に制限されないが、通常、以下の濃度範囲が適当である。

無細胞抽出液: 10~90重量%

目的とするタンパクをコードするDNA: 1~20 ng/ $\mu$ l

目的とするタンパクをコードするmRNA: 10~200 ng/ $\mu$ l

タンパクの構成アミノ酸: 50~300  $\mu$ M

ATP: 0.5~5 mM

GTP: 0.05~0.5 mM

クレアチンホスフェート: 10~100 mM

クレアチンホスフォキナーゼ: 0.02~5  $\mu$ g/ $\mu$ l

ホスフォエノールビルビン酸: 1~20 mM

ビルビン酸キナーゼ: 0.01~1  $\mu$ g/ $\mu$ l

ジチオスレイトール(DTT): 1~10 mM

スベルミジン: 0.1~5 mM

スベルミン: 0.01~0.5 mM

【0010】本発明者らの研究により、タンパク合成反応に必要なアミノ酸や基質エネルギー物質には至適濃度

があり、その濃度を一定に保つことが重要であること、また最終副産物であるAMP、GDP、ピロリン酸塩、無機リン酸塩等が蓄積すると合成反応が阻害されることが見出されている。これらを解決する方法として先に説明したように特開平1-50311号公報に示されたいわゆる連続系が用いられている。しかし、この方法は高価な装置と厳密な送液条件を必要とし、限外濾過膜の目詰りが生じる等、必ずしも満足できる方法ではない。そこで、タンパク合成反応液中の種々の基質濃度を、簡便かつ安定に維持する方法を確立するため研究を進めた。その結果、合成反応液と、低分子基質溶液とを膜を介して接触させ、分子拡散させることによって、低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させ、合成反応液中の低分子基質濃度をほぼ一定に維持するとともに、合成反応液中で生産された反応阻害性の低分子副産物(AMP、GDP、ピロリン酸塩、無機リン酸塩等)を低分子基質溶液中に排出させることができ、その結果、反応の至適条件が維持され、タンパク合成活性が高まることが確認された。

20 【0011】このように本発明においてタンパク合成活性が高くなる主な理由は、合成反応液と低分子基質溶液が膜を介して接触し、低分子物質が膜を介して分子拡散するために、合成反応液中の基質濃度が低下すると膜を介して低分子基質が合成反応液中に拡散してその至適濃度が維持され、また合成反応液中で生成した反応阻害性の低分子副産物が膜を介して効率よく反応系から排出除去されるためであると考えられる。従って、合成反応液の量と低分子基質溶液の容量比は、1:1~1:100、好ましくは1:10~1:20程度とするのが適当である。また、低分子基質溶液中の低分子基質は、合成反応液中に移行し、同時に合成反応液からは副生した低分子物質が低分子基質溶液中に排出されるため、低分子基質溶液は新鮮なものを使用することが望ましい。このため、低分子基質溶液は一定時間後に新しいものと交換するか、常に新しいものを循環させることが望ましい。

【0012】本発明に使用される膜の例としては、通常、高分子物質と低分子物質の分離に使用されるいわゆる透析膜、限外濾過膜、セラミック膜、半透膜、中空子膜等、いかなる材質の膜でも良い。しかし、タンパク合成反応に必要な低分子基質及び反応により生成した反応阻害性の低分子副産物を効率よく透過させ、かつ主生産物であるタンパク、タンパク合成に必要なリボソーム、mRNA等の高分子物質を透過させないために、分画分子量が500以上10万以下である膜が望ましい。このような膜の具体例としては、中空糸膜(HC膜:旭化成工業社製、HIP10-20:アミコン社製)、分画分子量10,000の透析膜(Spectrum Por7: Spectrum社製、UC8-32-25:三光純薬社製)等が挙げられる。

【0013】本発明のタンパク合成装置の具体例を図1に示す。この図では、膜として円筒形の中空子膜(キャ

ピラリ膜)を使用し、円筒形キャピラリ膜の内側に基質溶液流路とし、円筒形キャピラリ膜の外側にタンパク合成反応液を収容している。これとは逆に、円筒形キャピラリ膜の外側を基質溶液流路とし、円筒形キャピラリ膜の内側にタンパク合成反応液を収容してもよい。また、キャピラリ膜は平面状であっても差し支えない。

【0014】以下、比較例及び実施例によって本発明を具体的に説明する。

#### 【実施例1及び比較例1】

##### 小麦胚芽抽出液の調製と抽出液の濃縮

Andersonらの方法(Methods in Enzymology 101巻、635-644項、1983年)に従って小麦胚芽抽出液の調製をおこなった。得られた抽出液6mlに50%ポリエチレングリコール6000水溶液4mlを添加し、氷冷下10分間スターラーを用いて攪拌し、その後15,000×gで5分間遠心分離し沈殿を得た。この沈殿に緩衝液1:20 mM HEPES buffer(KOHにてpH 8.0に調整)、120 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、1 mM DTT、720 µlに懸濁溶解し濃縮液を得た。

##### 【0015】無細胞タンパク合成反応

比較例1の反応液は、60 mM HEPES buffer(KOHにてpH 7.6に調整)、3 mM ATP、100 µM GTP、8 mM DTT、45 mM クレアチンりん酸、1 µg/µl クレアチンホスホキナーゼ、0.5 mMスベルミジン、0.02 mM スベルミン、160 µMアミノ酸、1.0 U/µl RNase 阻害剤、0.5 µg/µl tRNA、45 ng/µl DHFR(ジヒドロフォレートレダクターゼ) mRNA、2.5 mM Mg<sup>2+</sup>、小麦胚芽抽出液5 µlの組成からなり、全量を15 µlとした。反応は26℃で所定の時間行なった。実施例1の反応液は、上記比較例1と同組成の反応液200 µlを分画分子量13,000の中空糸膜(HC膜、旭化成工業社製)の外側部分に注入した。一方、中空糸膜の内側には、比較例1の組成からmRNA RNase 阻害剤、クレアチンホスホキナーゼを除き、小麦胚芽抽出液の代わりに緩衝液1を35%添加した組成の溶液10mlをベリスタルチックポンプ(ATTO社製)にて0.7 ml/minの速度で循環させた。反応システム全体の概略を図1に示す。反応液量に対する膜面積は33 cm<sup>2</sup>/mlであった。一定時間毎に反応液より10 µlをとり、次の反応条件にてDHFRの活性を測定した。50 mMりん酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、500 µMジヒドロフォレート、60 µM β-NADPH、18 mM 2-メルカプトエタノール、37℃において反応液中の340 nm吸光度の減少を測定した。結果を図2に示す。比較例1では2時間後には反応が飽和し、DHFR活性が増大しないのに対して、実施例1では4時間後もDHFR活性が増大していることがわかる。

##### 【0016】

【試験例1】無細胞タンパク合成反応が、通常1~2時

間で停止してしまう主要な原因は、反応液中のエネルギー基質(ATP、GTP)濃度の急激な低下であることが、Biosci. Biotech. Biochem., 58巻、1911頁、1994年に明らかにされている。そこで実施例1の反応液中のATP、GTP濃度をJ. Appl. Biochem., 5巻、330頁、1983年に従い、HPLC法で定量した。結果を図3に示す。実施例1の反応液中のエネルギー基質(ATP、GTP)濃度は、反応開始時から4時間後まではほぼ一定に保持されていることがわかる。このことは、実施例1において長時間に渡ってDHFR活性が増大しているのは、反応液中にエネルギー基質が適切に供給されたためであることを示している。

##### 【0017】

##### 【実施例2及び比較例2】

##### 小麦胚芽抽出液の調製

実施例1と同様の方法で小麦胚芽抽出液の調製を行った。

##### 無細胞タンパク合成反応

比較例2の反応液は、60 mM HEPES buffer(KOHにてpH 7.6に調整)、1 mM ATP、100 µM GTP、2 mM DTT、12 mM クレアチンりん酸、40 µg/ml クレアチンホスホキナーゼ、0.1 mM スベルミジン、0.01 mM スベルミン、160 µMアミノ酸、1.0 U/µl RNase 阻害剤、1 ng/µl DHFR(ジヒドロフォレートレダクターゼ) mRNA、2.8 mM Mg<sup>2+</sup>、小麦胚芽抽出液5 µlの組成からなり、全量を15 µlとした。ただし、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>濃度は、小麦胚芽抽出液からの持ち込みも合わせた値で表した。反応は30℃で2時間行なった。実施例2の反応液は、上記比較例2と同組成の反応液135 µlを分画分子量10,000の透析膜(Spectrum Por7、Spectrum社製)に封入し、比較例2の組成からmRNA RNase 阻害剤を除き、小麦胚芽抽出液の代わりに緩衝液1を添加した組成の溶液30ml中に沈め、溶液全体をスターラーで攪拌しながら30℃で2時間反応させた。反応終了後の反応液より5.5 µlをとり、次の反応条件にてDHFRの活性を測定した。50 mMりん酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、500 µMジヒドロフォレート、60 µM β-NADPH、18 mM 2-メルカプトエタノール、37℃において反応液中の340 nm吸光度の減少を測定した。結果を図4に示す。実施例2では比較例2より反応生成物の収量が約40%高いことがわかる。

##### 【0018】

【発明の効果】本発明方法では、高価な機器と厳密な送液条件を必要とせず、合成反応液中のタンパク合成反応に必要な低分子基質の濃度を一定に保つことができ、同時に低分子の副産物が効率よく反応系外へ排出される。更に分子拡散であるため、濾過膜の目詰りといった問題も生じない。これらのため、タンパク合成量を顕著に高くすることができる。

【図面の簡単な説明】

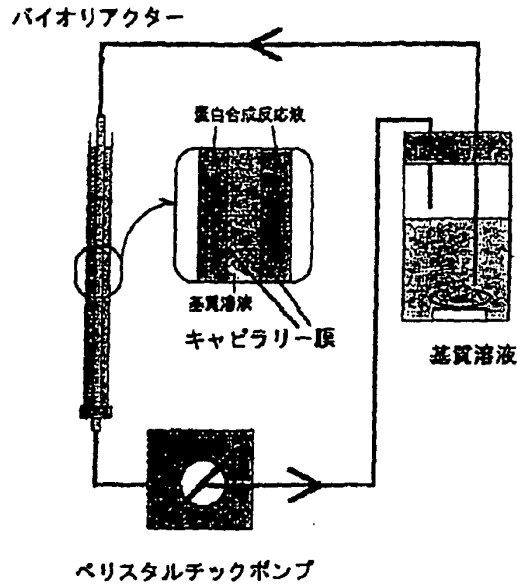
【図1】本発明の実施例に使用した反応システムの概略を示す図面である。

【図2】実施例1及び比較例1のDHFRの生産量の経時変化を示すグラフである。

【図3】実施例1における合成反応液中のATP及びGTPの濃度の経時変化を示すグラフである。

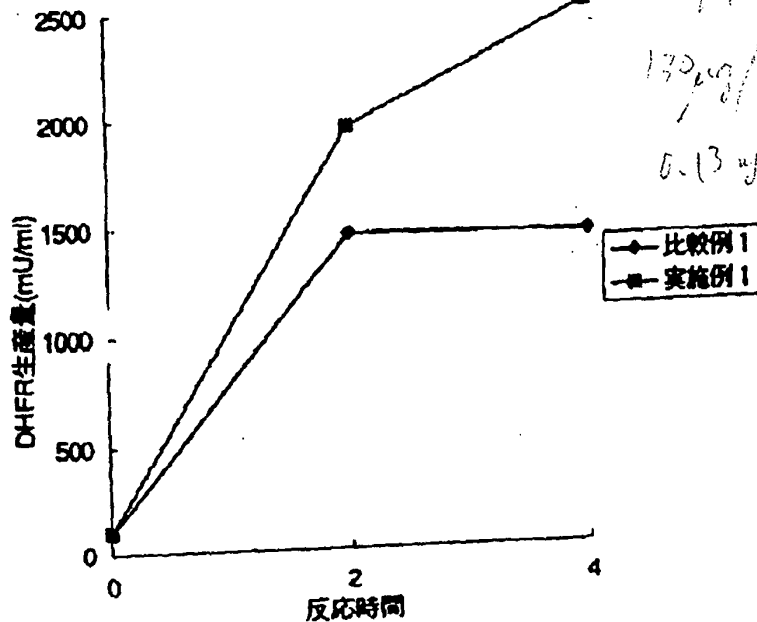
【図4】実施例2及び比較例2のDHFRの生産量の経時変化を示すグラフである。

【図1】



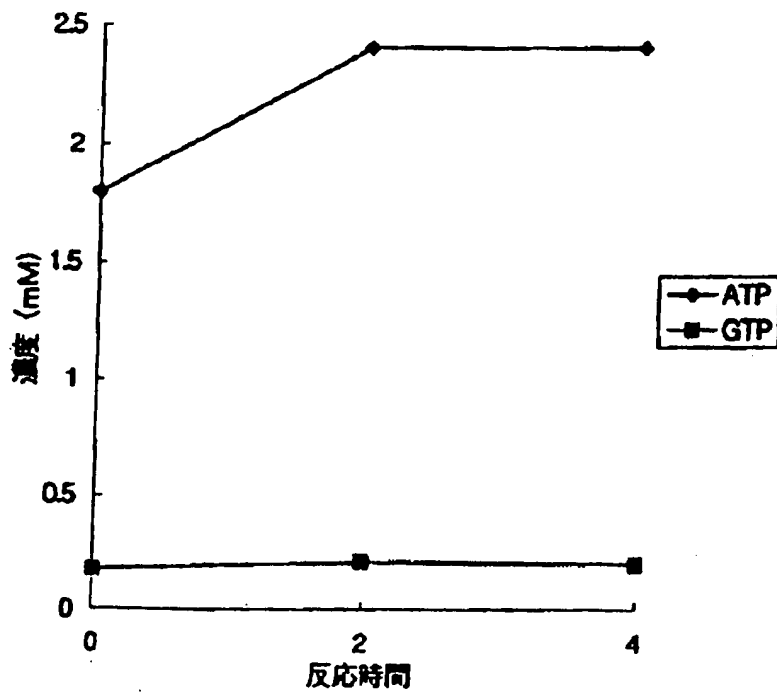
【図2】

比較例1、実施例1



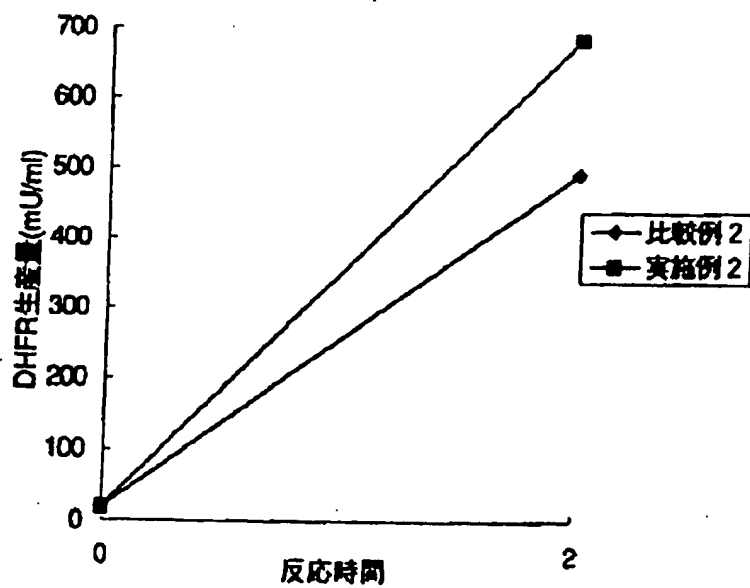
【圖 3】

## 試驗例 1



【圖 4】

## 比較例 2、実施例 2



36.6 μg / ml  
200  
100

フロントページの続き

(72)発明者 関口 哲

東京都世田谷区桜丘5-47-20-50

2





## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10080295 A**(43) Date of publication of application: **31.03.98**

(51) Int. Cl.

**C12P 21/00****// C07H 21/02****C07H 21/04****C12N 15/09**(21) Application number: **09090685**(22) Date of filing: **09.04.97**(30) Priority: **15.07.96 JP 08184372**(71) Applicant: **NIPPON FLOUR MILLS CO LTD**(72) Inventor: **YAMANE TSUNEO  
NAKANO HIDEO  
TANAKA TADAAKI  
SEKIGUCHI SATORU****(54) SYNTHESIS OF PROTEIN BY CELL-FREE  
PROTEIN SYNTHETIC SYSTEM AND  
APPARATUS THEREFOR**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for synthesizing a protein by using a cell-free protein synthetic system, capable of stably and simply synthesizing a sufficient amount of protein and a method for synthesizing the protein.

**SOLUTION:** In the synthesis of a protein using a cell-free protein synthetic system containing a cell-free extract, a synthetic reaction solution containing cell-free extracted solution and low molecule substrate is brought through a membrane into contact with a low molecular substrate solution and the low molecular substrate in the low molecular substrate solution is transferred to a synthetic

reaction solution by molecular diffusion. Thereby, the concentration of low molecular substrate in the synthetic reaction solution is kept to nearly constant value and low molecular by-products in the synthetic reaction solution are discharged into the low molecular substrate solution.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-80295

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月31日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/00			C 1 2 P 21/00	C
// C 0 7 H 21/02			C 0 7 H 21/02	
21/04			21/04	B
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平9-90685	(71) 出願人	000231637 日本製粉株式会社 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目27番5号
(22) 出願日	平成9年(1997) 4月9日	(72) 発明者	山根 恒夫 愛知県名古屋市千種区若水3丁目22-1
(31) 優先権主張番号	特願平8-184372	(72) 発明者	中野 秀雄 愛知県岩倉市東新町下境52 岩倉団地61-206号
(32) 優先日	平8(1996) 7月15日	(72) 発明者	田中 忠明 神奈川県横浜市旭区東希望が丘169 ヘー ベルメゾン東希望が丘203号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	関口 哲 東京都世田谷区桜丘5-47-20-502
		(74) 代理人	弁理士 中村 稔 (外7名)

(54) 【発明の名称】 無細胞タンパク合成系によるタンパクの合成方法及び装置

## (57) 【要約】

【課題】 安定かつ簡便に十分な量のタンパクを合成させることのできる、無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成方法、及びタンパクの合成装置を提供すること。

【解決手段】 無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成方法において、無細胞抽出液及び低分子基質を含有する合成反応液と、低分子基質溶液とを膜を介して接触させ、分子拡散によって低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させることにより、合成反応液中の低分子基質濃度をほぼ一定に維持するとともに、合成反応液中の低分子副産物を低分子基質溶液中に排出させることを特徴とするタンパクの合成方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成方法において、無細胞抽出液及び低分子基質を含有する合成反応液と、低分子基質溶液とを膜を介して接触させ、分子拡散によって低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させることにより、合成反応液中の低分子基質濃度をほぼ一定に維持するとともに、合成反応液中の低分子副産物を低分子基質溶液中に排出させることを特徴とするタンパクの合成方法。

【請求項2】 無細胞抽出液が小麦胚芽抽出液である請求項1記載の方法。

【請求項3】 無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成装置において、無細胞抽出液及び低分子基質を含有する合成反応液の収容室と、低分子基質溶液の収容室を、膜を介して接触させ、分子拡散によって低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させ、且つ、合成反応液中の低分子副産物を低分子基質溶液中に排出させるようにしたことを特徴とするタンパクの合成装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成方法及びタンパクの合成装置に関する。ここで無細胞タンパク合成系とは、mRNAの情報を読み取ってタンパクやポリペプチドを合成する無細胞翻訳系、並びにDNAを鋳型としてRNAを合成する無細胞転写系と無細胞翻訳系の両者を含む系の何れをも意味するものとする。

## 【0002】

【従来の技術】無細胞タンパク合成系を用いたタンパクやポリペプチドの製造方法として、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球、大腸菌等の抽出液を用いる方法が知られている。しかしながら、それらの抽出液を用いて量的に十分なタンパクを合成することは難しく、タンパクの合成量を増加させる為の種々の工夫がなされてきた。その一つとして、特開平1-50311号公報には、mRNA、ATP、GTP及びアミノ酸を基質として含んでいるリボソームの無細胞タンパク合成系において、最終副産物であるAMP、GDP、ピロリン酸塩、無機りん酸及び合成された主生産物のポリペプチドを含んでいる翻訳生成物を限外濾過膜を介して反応系から取り出し、それと同時にアミノ酸、ATP及びGTPの形態の基質を、それらの初期濃度を維持するために反応系へ供給するポリペプチドの製造方法が記載されている。この方法によれば、従来の方法では1時間程度でポリペプチドの合成が停止してしまうものが、40時間以上に渡って反応が継続し、合成されるポリペプチドの収量も大きく増加することが示されている。

【0003】また、この改良法として、特開平4-20

0390号公報には、基質の送液系や反応系中の気相の介在を最小限に制御することにより、反応槽内の圧力の変動を減らして基質の送液を安定化して、ポリペプチドを合成する方法が記載されている。更に、反応系より反応生成物を取り出す限外濾過膜を反応系の側面もしくは上面に置くことにより、下面に置くのに比べて膜の目詰りが軽減されることも合わせて記載されている。しかしながら、これらの方法は、高価な機器と厳密な送液条件を必要とし、また、限外濾過膜の目詰りが避けられないといった問題点があった。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的は、上記の従来技術の問題点を解決し、安定かつ簡便に十分な量のタンパクを合成させることのできる、無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成方法、及びタンパクの合成装置を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】前記の目的を達成するために、本発明者らは鋭意研究を重ね、無細胞タンパク合成に必要な低分子基質、例えばタンパクの合成材料であるアミノ酸や合成反応に必要なエネルギー源であるATP、GTP等の濃度を、膜を通した分子拡散によって初期濃度に維持することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。本発明は、無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの製造方法において、無細胞抽出液及び低分子基質を含有する合成反応液と、低分子基質溶液とを膜を介して接触させ、分子拡散によって低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させることにより、合成反応液中の低分子基質濃度をほぼ一定に維持するとともに、合成反応液中の低分子副産物を低分子基質溶液中に排出させることを特徴とするタンパクの合成方法を提供するものである。

【0006】本発明はさらに、無細胞抽出液を含む無細胞タンパク合成系を用いたタンパクの合成装置において、無細胞抽出液及び低分子基質を含有する合成反応液の収容室と、低分子基質溶液の収容室を、膜を介して接触させ、分子拡散によって低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させ、且つ、合成反応液中の低分子副産物を低分子基質溶液中に排出させるようにしたことを特徴とするタンパクの合成装置を提供するものである。

【0007】本発明はまた、基質溶液を収容する密閉基質容器と；キャピラリー膜を有し、入口部を上記密閉基質容器に連通したバイオリアクターと；吸入側を上記バイオリアクターの出口部に連通し、排出側を上記密閉基質容器に連通したベリスタルチックポンプとを有し；上記バイオリアクターにおいて、上記キャピラリー膜の一方の側に収容されたタンパク合成反応液と他方の側に収容された上記基質溶液とを上記キャピラリー膜を介して接触させることを特徴とするタンパク合成装置を提供す

るものである。本発明はさらに、バイオリアクターにキャピラリー膜を介して接する二つの画室を形成し、一方の画室にタンパク合成反応液を収容し、他方の画室に基質溶液を収容し、タンパク合成反応液と基質溶液とを上記キャピラリー膜を介して接触させることを特徴とするタンパク合成装置を提供するものである。

#### 【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明に使用する無細胞抽出液の調製から無細胞タンパク合成系におけるタンパク合成活性の測定までの各段階について詳細に説明する。本発明に使用する無細胞抽出液としては、例えば、小麦胚芽抽出液及び大腸菌細胞抽出液等があげられる。この明細書において、タンパク合成活性は、合成された酵素タンパクの酵素量（1 unit：1分間に1  $\mu$ molの基質を変化させる酵素量）で表す。

##### i 無細胞抽出液の調製と抽出液の濃縮

無細胞抽出液の調製は、用いる材料に応じて異なるが、通常のいかなる方法を用いても良い。また、抽出液の濃縮は、特開平6-225783号公報に記載された方法等、いかなる方法を用いても良い。

##### ii 無細胞タンパク合成反応

反応液には、無細胞抽出液の他、目的とするタンパクをコードするDNA、mRNA、RNAポリメラーゼ、タンパクの構成アミノ酸、緩衝剤、ATP、GTP等のエネルギー源、クレアチンホスフェート、クレアチンホスフォキナーゼ、ホスフォエノールピルビン酸、ピルビン酸キナーゼ等のATP再生系、ジチオスレイトール（DTT）、スベルミン、スベルミジン等の安定化剤、RNase阻害剤等を適量加える。反応は、用いる無細胞抽出液及び目的とするタンパクの種類等により最適の温度で行われ、一般に20～40℃が適当である。

【0009】合成反応液中の各成分の濃度は特に制限されないが、通常、以下の濃度範囲が適当である。

無細胞抽出液：10～90重量%

目的とするタンパクをコードするDNA：1～20 ng/ $\mu$ l

目的とするタンパクをコードするmRNA：10～200 ng/ $\mu$ l

タンパクの構成アミノ酸：50～300  $\mu$ M

ATP：0.5～5 mM

GTP：0.05～0.5 mM

クレアチンホスフェート：10～100 mM

クレアチンホスフォキナーゼ：0.02～5  $\mu$ g/ $\mu$ l

ホスフォエノールピルビン酸：1～20 mM

ピルビン酸キナーゼ：0.01～1  $\mu$ g/ $\mu$ l

ジチオスレイトール（DTT）：1～10 mM

スベルミジン：0.1～5 mM

スベルミン：0.01～0.5 mM

【0010】本発明者らの研究により、タンパク合成反応に必要なアミノ酸や基質エネルギー物質には至適濃度

があり、その濃度を一定に保つことが重要であること、また最終副産物であるAMP、GDP、ピロリン酸塩、無機リン酸塩等が蓄積すると合成反応が阻害されることが見出されている。これらを解決する方法として先に説明したように特開平1-50311号公報に示されたいわゆる連続系が用いられている。しかし、この方法は高価な装置と厳密な送液条件を必要とし、限外濾過膜の目詰りが生じる等、必ずしも満足できる方法ではない。そこで、タンパク合成反応液中の種々の基質濃度を、簡便かつ安定に維持する方法を確立するため研究を進めた。その結果、合成反応液と、低分子基質溶液とを膜を介して接触させ、分子拡散させることによって、低分子基質溶液中の低分子基質を合成反応液中に移行させ、合成反応液中の低分子基質濃度をほぼ一定に維持するとともに、合成反応液中で生産された反応阻害性の低分子副産物（AMP、GDP、ピロリン酸塩、無機リン酸塩等）を低分子基質溶液中に排出させることができ、その結果、反応の至適条件が維持され、タンパク合成活性が高まることが確認された。

20 【0011】このように本発明においてタンパク合成活性が高くなる主な理由は、合成反応液と低分子基質溶液が膜を介して接触し、低分子物質が膜を介して分子拡散するために、合成反応液中の基質濃度が低下すると膜を介して低分子基質が合成反応液中に拡散してその至適濃度が維持され、また合成反応液中で生成した反応阻害性の低分子副産物が膜を介して効率良く反応系から排出除去されるためであると考えられる。従って、合成反応液の量と低分子基質溶液の容量比は、1：1～1：100、好ましくは1：10～1：20程度とするのが適当である。また、低分子基質溶液中の低分子基質は、合成反応液中に移行し、同時に合成反応液からは副生した低分子物質が低分子基質溶液中に排出されるため、低分子基質溶液は新鮮なものを使用することが望ましい。このため、低分子基質溶液は一定時間後に新しいものと交換するか、常に新しいものを循環させることが望ましい。

40 【0012】本発明に使用される膜の例としては、通常、高分子物質と低分子物質の分離に使用されるいわゆる透析膜、限外濾過膜、セラミック膜、半透膜、中空子膜等、いかなる材質の膜でも良い。しかし、タンパク合成反応に必要な低分子基質及び反応により生成した反応阻害性の低分子副産物を効率よく透過させ、かつ主生産物であるタンパク、タンパク合成に必要なリボソーム、mRNA等の高分子物質を透過させないために、分画分子量が500以上10万以下である膜が望ましい。このような膜の具体例としては、中空糸膜（HC膜：旭化成工業社製、HIP10-20：アミコン社製）、分画分子量10,000の透析膜（Spectrum Por7：Spectrum社製、UC8-32-25：三光純薬社製）等が挙げられる。

50 【0013】本発明のタンパク合成装置の具体例を図1に示す。この図では、膜として円筒形の中空子膜（キャ

ピラリ膜)を使用し、円筒形キャピラリ膜の内側を基質溶液流路とし、円筒形キャピラリ膜の外側にタンパク合成反応液を収容している。これとは逆に、円筒形キャピラリ膜の外側を基質溶液流路とし、円筒形キャピラリ膜の内側にタンパク合成反応液を収容してもよい。また、キャピラリ膜は平面状であっても差し支えない。

【0014】以下、比較例及び実施例によって本発明を具体的に説明する。

#### 【実施例1及び比較例1】

小麦胚芽抽出液の調製と抽出液の濃縮

Andersonらの方法(Methods in Enzymology 101 巻、63 5-644 項、1983年)に従って小麦胚芽抽出液の調製をおこなった。得られた抽出液6mlに50%ポリエチレングリコール6000水溶液4mlを添加し、氷冷下10分間スターラーを用いて攪拌し、その後15,000×gで5分間遠心分離し沈殿を得た。この沈殿に緩衝液1:20 mM HEPES buffer(KOHにてpH 8.0に調整)、120 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、1 mM DTT、720 μl に懸濁溶解し濃縮液を得た。

#### 【0015】無細胞タンパク合成反応

比較例1の反応液は、60 mM HEPES buffer(KOHにてpH 7.6に調整)、3 mM ATP、100 μM GTP、8 mM DTT、45 mM クレアチンリン酸、1 μg/μl クレアチンホスホキナーゼ、0.5 mM スペルミジン、0.02 mM スペルミン、160 μM アミノ酸、1.0 U/μl RNase 阻害剤、0.5 μg/μl tRNA、45 ng/μl DHFR (ジヒドロフォレートレダクターゼ) mRNA、2.5 mM Mg<sup>2+</sup>、小麦胚芽抽出液5 μlの組成からなり、全量を15 μlとした。反応は26℃で所定の時間行った。実施例1の反応液は、上記比較例1と同組成の反応液200 μlを分画分子量13,000の中空糸膜(HC膜、旭化成工業社製)の外側部分に注入した。一方、中空糸膜の内側には、比較例1の組成からmRNA RNase 阻害剤、クレアチンホスホキナーゼを除き、小麦胚芽抽出液の代わりに緩衝液1を35%添加した組成の溶液10 mlをペリスタルチックポンプ(ATTO社製)にて0.7 ml/minの速度で循環させた。反応システム全体の概略を図1に示す。反応液量に対する膜面積は33 cm<sup>2</sup>/mlであった。一定時間毎に反応液より10 μlをとり、次の反応条件にてDHFRの活性を測定した。50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、500 μM ジヒドロフォレート、60 μM β-NADPH、18 mM 2-メルカプトエタノール。37℃において反応液中の340 nm吸光度の減少を測定した。結果を図2に示す。比較例1では2時間後には反応が飽和し、DHFR活性が増大しないのに対して、実施例1では4時間後もDHFR活性が増大していることがわかる。

#### 【0016】

【試験例1】無細胞タンパク合成反応が、通常1~2時

間で停止してしまう主要な原因は、反応液中のエネルギー基質(ATP、GTP)濃度の急激な低下であることが、Biosci. Biotech. Biochem., 58巻、1911頁、1994年に明らかにされている。そこで実施例1の反応液中のATP、GTP濃度をJ. Appl. Biochem., 5巻、330頁、1983年に従い、HPLC法で定量した。結果を図3に示す。実施例1の反応液中のエネルギー基質(ATP、GTP)濃度は、反応開始時から4時間後まではほぼ一定に保持されていることがわかる。このことは、実施例1において長時間に渡ってDHFR活性が増大しているのは、反応液中にエネルギー基質が適切に供給されたためであることを示している。

#### 【0017】

#### 【実施例2及び比較例2】

小麦胚芽抽出液の調製

実施例1と同様の方法で小麦胚芽抽出液の調製を行った。

無細胞タンパク合成反応

比較例2の反応液は、60 mM HEPES buffer(KOHにてpH 7.6に調整)、1 mM ATP、100 μM GTP、2 mM DTT、12 mM クレアチンリン酸、40 μg/ml クレアチンホスホキナーゼ、0.1 mM スペルミジン、0.01 mM スペルミン、160 μM アミノ酸、1.0 U/μl RNase 阻害剤、1 ng/μl DHFR (ジヒドロフォレートレダクターゼ) mRNA、2.8 mM Mg<sup>2+</sup>、小麦胚芽抽出液5 μlの組成からなり、全量を15 μlとした。ただし、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>濃度は、小麦胚芽抽出液からの持ち込みも合わせた値で表した。反応は30℃で2時間行った。実施例2の反応液は、上記比較例2と同組成の反応液135 μlを分画分子量10,000の透析膜(Spectrum Por7、Spectrum社製)に封入し、比較例2の組成からmRNA RNase 阻害剤を除き、小麦胚芽抽出液の代わりに緩衝液1を添加した組成の溶液30 ml中に沈め、溶液全体をスターラーで攪拌しながら30℃で2時間反応させた。反応終了後の反応液より5.5 μlをとり、次の反応条件にてDHFRの活性を測定した。50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、500 μM ジヒドロフォレート、60 μM β-NADPH、18 mM 2-メルカプトエタノール。37℃において反応液中の340 nm吸光度の減少を測定した。結果を図4に示す。実施例2では比較例2より反応生成物の収量が約40%高いことがわかる。

#### 【0018】

【発明の効果】本発明方法では、高価な機器と厳密な送液条件を必要とせずに、合成反応液中のタンパク合成反応に必要な低分子基質の濃度を一定に保つことができ、同時に低分子の副産物が効率よく反応系外へ排出される。更に分子拡散であるため、濾過膜の目詰りといった問題も生じない。これらのため、タンパク合成量を顕著に高くすることができる。

【図面の簡単な説明】

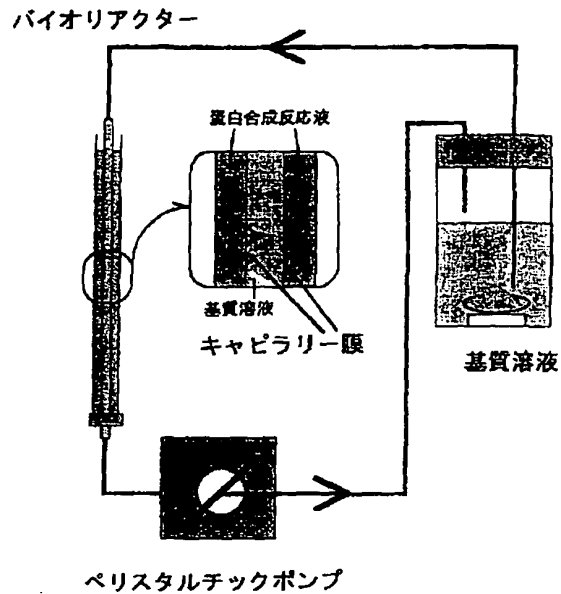
【図1】本発明の実施例に使用した反応システムの概略を示す図面である。

【図2】実施例1及び比較例1のDHFRの生産量の経時変化を示すグラフである。

\* 【図3】実施例1における合成反応液中のATP及びGTPの濃度の経時変化を示すグラフである。

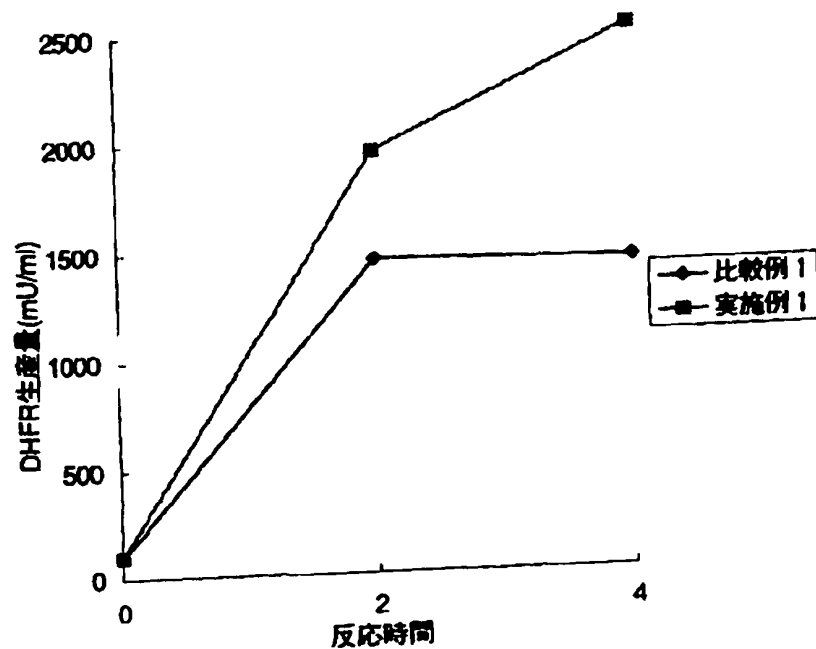
\* 【図4】実施例2及び比較例2のDHFRの生産量の経時変化を示すグラフである。

【図1】



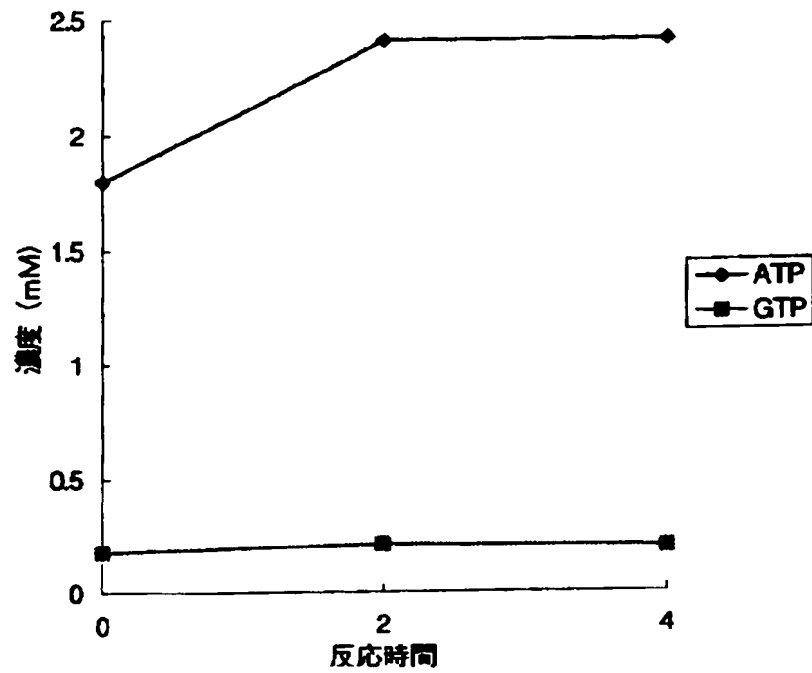
【図2】

比較例1、実施例1



【図3】

## 試験例1



【図4】

## 比較例2、実施例2

